

反转录环介导等温扩增技术检测藜草花叶病毒

A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of *Sowbane mosaic virus*

杨姗姗^{1,2} 廖富荣^{2*} 艾洪木^{1*}

(1. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002; 2. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 厦门 361026)

Yang Shanping^{1,2} Liao Furong^{2*} Ai Hongmu^{1*}

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China;

2. Inspection and Quarantine Technology Center, Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, Fujian Province, China)

藜草花叶病毒(*Sowbane mosaic virus*, SoMV)为南方菜豆花叶病毒属 *Sobemovirus* 的成员, 被我国列为禁止进境的检疫性有害生物, 它不仅可以在藜科杂草, 也可侵染葡萄、甜菜、菠菜等经济植物(沈淑琳, 1990), 主要分布于欧洲及南北美洲国家及南非、日本、土耳其等国家或地区, 可通过汁液、昆虫及种子传播。目前, 国内外已建立了 SoMV 的 RT-PCR 检测方法(陈青等, 2010), 但尚未有反转录环介导等温扩增方法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)的研究报道。本研究通过建立 SoMV 的 RT-LAMP 检测方法, 以期为我国口岸检验检疫部门建立简便、灵敏、特异的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病叶及病毒: SoMV 病叶, 来自美国典型培养物保藏中心; 南方菜豆花叶病毒(*Southern bean mosaic virus*, SBMV)和豇豆花叶病毒(*Cowpea mosaic virus*, CPMV), 美国 Agdia Incorporated 公司。苋色藜、莲子草、菠菜等由厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心植物检疫实验室保存。

试剂及仪器: Easy Taq DNA 聚合酶、pd(N)6, 北京全氏金生物技术有限公司; Bst 2.0 DNA 聚合酶、10×Bst DNA Buffer, 北京纽英伦生物技术有限公司; SYBR Green I, 宝生物工程(大连)有限公司; M-MLV 反转录酶、RNasin, 美国 Promega 公司; TriPure Isolation Reagent 试剂盒, 美国 Invitrogen 公司。Verti TM 多重控温 PCR 仪, 美国 ABI 公司; MINI-PRATEA 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; BOXCHEME XT16 多功能数字凝胶成像系统, 美国 Syngene 公司。

1.2 方法

根据 SoMVCP 基因(GenBank 登录号: GQ845002)、利用在线软件 Primer Explorer V4 (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) 设计引物(表 1), 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

反转录: 按照 TriPure Isolation Reagent 试剂盒操作说明提取病叶总 RNA, 然后取总 RNA 4 μL、0.1 nmol/L pd(N)6 2 μL、DEPC 处理水 5 μL, 95°C 水浴 10 min; 冰浴 5 min 后, 继续加入 5×Buffer 4 μL、10 mmol/L 的 dNTPs 1.0 μL、200 U/μL M-MLV 反转录酶 0.5 μL、40 U/μL RNasin 0.5 μL, 37°C 水浴 1 h, 95°C 灭活 5 min, 合成第一链 cDNA。

25 μL LAMP 反应体系: 10×Bst DNA Buffer 2.5 μL、8 U/μL Bst 2.0 DNA 聚合酶 1 μL、100 mmol/L MgSO₄ 1.5 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、10 μmol/L FIP 和 BIP 各 3 μL、10 μmol/L F3 和 B3 各 0.5 μL、5 mol/L 甜菜碱 3.5 μL、模板 cDNA 2 μL, 最后用 ddH₂O 补至 25 μL。64°C 孵育 60 min。反应结束后, 在反应管中加入 1.0 μL SYBR Green I 染料, 观察颜色反应; 或取 5 μL 扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, EB 染色后在凝胶成像仪上观察、拍照。

25 μL PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL、10 μmol/L SoMV-F3.6 及 SoMV-B3.6 各 2 μL、5 U/μL Easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、cDNA 模板 3 μL、ddH₂O 14.5 μL。反应程序: 95°C 3 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s, 35 个循环; 72°C 10 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

特异性及灵敏度检测: 利用所建立的 RT-LAMP 方法, 对感染 SoMV、SBMV、CPMV 的阳性对照样

基金项目: 福建省自然科学基金(2015J01148), 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2015IK190), 厦门市科技计划项目(3502Z20154080)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: lft005@163.com, aihongmu@fafu.edu.cn; 收稿日期: 2017-02-28

品及健康植物苋色藜、莲子草、菠菜进行检测,以明确该方法的特异性。把 SoMV 的 cDNA 进行 10 倍系列

稀释(10^{-1} ~ 10^{-9}),利用所建立的 RT-LAMP 方法进行检测。且利用 RT-PCR 进行灵敏度比较试验。

表 1 用于扩增 SoMV 的 LAMP 及 PCR 引物

Table 1 LAMP and PCR primer sequences of SoMV

引物组 Primer set	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
组 1 Set1	SoMV-F3.1	CGTCATTGGACAAAAGATATGAACC
	SoMV-B3.1	TGTCAGTGGTGGAGACTATCG
	SoMV-FIP.1	ACAACCTCGCGCTGTGGACTTGTCCAGACCACGGAACAAAC
	SoMV-BIP.1	TCACAACCTGCTGCGAAAGGAAGACGAAGACGGAGAACGC
组 6 Set 6	SoMV-F3.6	CGTCATTGGACAAAAGATATGAACC
	SoMV-B3.6	GACTAGGTTAACCGATCTAACAGTA
	SoMV-FIP.6	CGCGCTGTGGACTTGTGGGGAAGAAGAAGTCCAGACCA
	SoMV-BIP.6	GGCAGGGCTATGCCTGTGTTGACTATCGTTTGCATATTTTCGTGG
组 4 Set 4	SoMV-F3.4	CCGAAGATATCTAGTCCAAGAACT
	SoMV-B3.4	ACCATTGAACACAGGCATAGC
	SoMV-FIP.4	TGTTTGTCCGTGGTCTGGACTTCCGTCATTGGACAAAAGATATGAAC
	SoMV-BIP.4	AGCACAGCCCAACAAGTCCACCTGCCATAACAATTCCTTTC

2 结果与分析

2.1 LAMP 引物筛选

扩增结果表明,引物组 1、4 无明显的梯状条带,而引物组 6 产生的梯状条带最为明显,扩增效果最好。因此,选择引物组 6 进行条件优化和特异性、灵敏度检测。

2.2 RT-LAMP 的特异性检测结果

结果表明,只有 SoMV 阳性样品出现特征梯状

条带,而其它病毒和健康植物样品中未产生,与 RT-PCR 的检测结果相同,显示出良好的特异性。

2.3 RT-LAMP 的灵敏度检测结果

所建立的 RT-LAMP 方法可检测到 10^{-7} 的 cDNA 模板(图 1-a),其灵敏度与普通 RT-PCR 方法相当(图 1-b)。当 LAMP 结果进行染色检测时, 10^{-1} ~ 10^{-9} 样品的反应管中产生绿色,为阳性反应,而其它为橙色,为阴性反应。

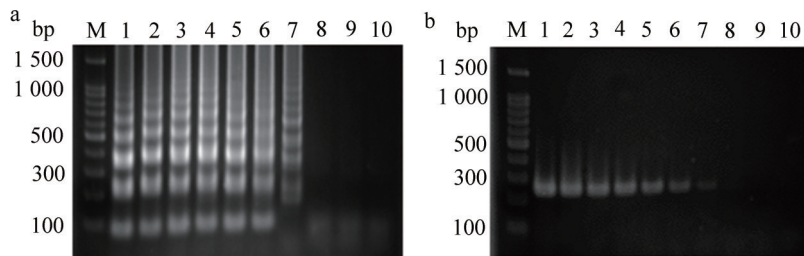


图 1 SoMV 的 RT-LAMP(a)和 RT-PCR(b)灵敏度检测结果

Fig. 1 Sensitivity of RT-LAMP (a) and RT-PCR (b) for the detection of SoMV

M: 100 bp marker; 1~9: 稀释 10^{-1} ~ 10^{-9} 倍的 cDNA; 10: 空白对照。1~9: 10^{-1} ~ 10^{-9} times dilution of cDNA; 10: negative control.

3 讨论

LAMP 近年来越来越多被应用于植物病毒快速检测中,本研究根据 SoMV 的 CP 基因设计 3 组引物,通过引物筛选、条件优化,建立了 SoMV 的 RT-LAMP 方法。LAMP 方法具有比 PCR 方法更高的灵敏度(郭立新等, 2013),而本研究所建立的检测 SoMV 的 RT-LAMP 方法,其灵敏度与普通 RT-PCR 方法相当,这可能是由于用于比较的 RT-PCR 方法其扩增片段比较小,也具有很高的灵敏度。在 LAMP 方法中,至少需要 4 条引物,因而与普通 PCR 相比,具有更高的灵敏度。LAMP 的扩增产物不仅可以用凝胶电泳检测,而且可以直接沉淀观察或用荧光染料检测。本试验中,反应结束后在原反应管中加入 SYBR Green I 染料,实现了扩增产物的快速检测。

参 考 文 献 (References)

- Chen Q, Li GF, Dong Q, Chen HY, Liao FR, Chen HJ, Zhu SF. 2010. Cloning of coat protein gene and RT-PCR detection of *Sowbane mosaic virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(4): 438-441 (in Chinese) [陈青, 李桂芬, 董菁, 陈红运, 廖富荣, 陈洪俊, 朱水芳. 2010. 藜草花叶病毒外壳蛋白基因的克隆与 RT-PCR 检测. *植物病理学报*, 40(4): 438-441]
- Guo LX, Duan WJ, Xu YF, Liu YF, Zhang JH. 2013. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection *Bean pod mottle virus*. *Journal of Plant Protection*, 40(5): 473-474 (in Chinese) [郭立新, 段维军, 徐亚飞, 刘永丰, 张吉红. 2013. 逆转录环介导等温扩增技术检测菜豆荚斑病毒. *植物保护学报*, 40(5): 473-474]
- Shen SM. 1990. Introduced a very easy to spread from abroad, the virus-*Sowbane mosaic virus*. *Plant Quarantine*, 4(4): 246-247 (in Chinese) [沈淑琳. 1990. 介绍一种极易从国外传入的种传病毒——藜草花叶病毒. *植物检疫*, 4(4): 246-247]

(责任编辑:王 璇)